

## 산약(山藥; *Dioscorea Rhizoma*)으로부터 Dioscin의 분리 분석

남두현\* · 손건호<sup>1</sup> · 김종연<sup>2</sup> · 김순동<sup>3</sup> · 임상규<sup>4</sup>

영남대학교 약학대학, <sup>1</sup>안동대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>영남대학교 의과대학,  
<sup>3</sup>대구가톨릭대학교 식품산업공학부, <sup>4</sup>(주)경인제약

## Quantitative Determination of Dioscin from *Dioscorea Rhizoma*

Doo Hyun Nam\*, Kun Ho Son<sup>1</sup>, Jong Yeon Kim<sup>2</sup>, Soon Dong Kim<sup>3</sup>, and Sang Kyu Lim<sup>4</sup>

Faculty of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

<sup>2</sup>College of Medicine, Yeungnam University, Daegu 705-717, Korea

<sup>3</sup>Faculty of Food Industrial Technology, Catholic University of Daegu, Gyongsan 712-702, Korea

<sup>4</sup>Kyeong-In Pharmaceutical Company, Daegu 705-804, Korea

**Abstract** – The quantitative analytical method for the content of dioscin in *Dioscorea* rhizoma using a high performance liquid chromatography (HPLC) system was established for its quality control. After extracting *Dioscorea* rhizoma flour with ethanol, dioscin was separated through an ODS column with a flow rate of 1.0 ml/min of acetonitril-methanol-0.01 M phosphate buffer (pH 5.0) (6:3:1, v/v%), and the amount of dioscin was detected at 210 nm. Retention time of dioscin in HPLC chromatogram were about 7.45±0.34 min and calibration curve showed good linearity at concentrations from 0.1 to 2.0 mg/ml of dioscin. When 5 commercial *Dioscorea* rhizoma flours were analyzed by HPLC, the peak for dioscin was well separated from others in ethanol extract of *Dioscorea* rhizoma, and the amount of dioscin was in the range from 0.076 to 0.142(w/w)%.

**Key words** – *Dioscorea* rhizoma, dioscin, HPLC, quantitative determination

전 세계적으로 *Dioscorea* 속 식물은 식용으로 널리 재배되고 있다. 특히 아시아 지역에서 주로 재배되는 *Dioscorea* 속 식물은 *D. batatas* Decne 또는 *D. opposita* Thunb로,<sup>1)</sup> 이의 근경은 중국 약전<sup>2)</sup> 등에 식육부진, 판성설사, 당뇨, 백대하 등의 치료에 이용되는 약재로 수재되어 있다. 대한약전<sup>3)</sup>에서도 *Dioscorea batatas* Decaisne 또는 *Dioscorea japonica* Thunberg의 주피를 제거한 뿌리줄기(담근체)를 그대로 또는 찌서 말린 것을 산약(山藥)으로 수재하고 있다. 최근의 약리학적 연구를 통해, *Dioscorea* 근경은 면역조절 효과,<sup>4,5)</sup> 항염효과,<sup>6)</sup> 항암효과,<sup>7,8)</sup> 항골다공증효과<sup>9)</sup> 등 면역반응개선 활성이 밝혀지고 있다. 이외에도 *Dioscorea* 근경내 저장 단백질인 dioscorin의 항산화효과<sup>10,11)</sup>도 광범위하게 연구되고 있으며, 고혈당,<sup>12)</sup> 비만,<sup>13)</sup> 장 기능 및 지질 대사<sup>14,15)</sup> 등 대사성 질환 개선 효과도 증명되고 있다.

현재까지 *Dioscorea* 근경으로부터 분리된 성분은 점질성 다당류,<sup>5)</sup> dioscorin과 같은 저장 단백질,<sup>16)</sup> dioscin,<sup>17,18)</sup>

gracillin,<sup>19)</sup> furostanol<sup>20,21)</sup> 등의 streoid 성 saponin, 그리고 batatasin<sup>1)</sup> 등의 phenanthrene 유도체 등 4개의 군으로 대별될 수 있다, 그러나 현재까지 *Dioscorea* 근경인 산약의 품질평가를 위한 지표물질로서 점질성 다당류나 저장 단백질은 적합하지 않으며, streoid 성 saponin이나 phenanthrene 유도체는 함량이 낮아 이의 지표물질 발굴에 어려움을 겪고 있다. 최근에 황<sup>22)</sup>은 산약의 품질평가를 위한 지표물질로 allantoin을 제시하였지만, 이 물질은 자연계에 널리 존재하기 때문에 식별력에 한계를 갖고 있다. 따라서 본 연구에서는 산약 등 *Dioscorea* 근경으로부터 유래하는 제제들의 품질 평가를 위한 지표물질로 dioscin의 활용 가능성을 타진해 보았다.

### 재료 및 방법

**시료 및 검액 조제** - Table I에서 나타난 것 같이 마를 건조한 산약(마가루) 5종을 시중에서 생산지별로 구입하였다. 각 산약 분말 10 g을 100 ml ethanol로 30°C에서 하룻밤 추

\*교신저자(E-mail) : dhnam@yu.ac.kr  
(FAX) : 053-810-4654

**Table I.** Dioscin content of commercial *Dioscorea* rhizoma flour

Sample No.	Producer	Dioscin content (%)
1	Bukhu Agricultural Cooperative (509-2 Ongcheon-ri, Bukhu-myeon, Andong, Korea)	0.142±0.021
2	Pyeonggeun Agricultural Cooperative (260 Keumkwang-ri, Pyeonggeun-myon, Youngju, Korea)	0.076±0.011
3	Seungriwon Company (642-136 Hyucheon-dong, Youngju, Korea)	0.118±0.024
4	Jahye Food Industry (27-15 Hancheon-ri, Deoksan-myon, Jincheon, Korea)	0.078±0.005
5	Cheolwon Eco-agricultural Cooperative (818-1 Odeok-ri, Dongsong-eup, Cheolwon, Korea)	0.119±0.004

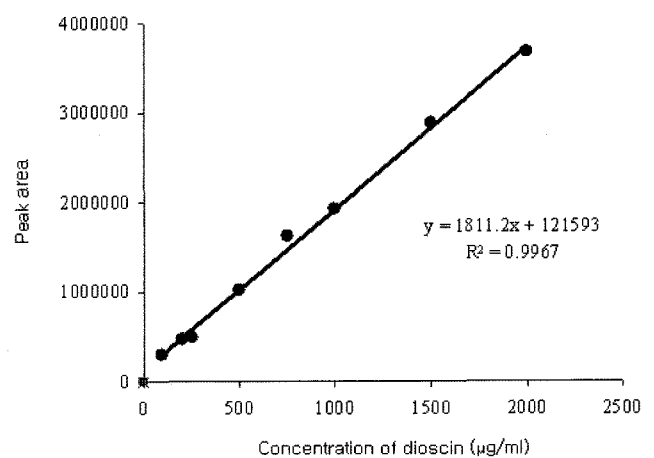
출한 후 Whatman 여과지로 걸러 불용분을 제거하고, 여액을 rotary evaporator로 농축한 후 다시 5 ml ethanol로 재추출하여 검액으로 하였다. 표준 dioscin은 안동대학교 손건호 교수로부터 기증받았다.

**박층 chromatography** - 산약의 ethanol 추출물 5 µl를 박층 chromatography (TLC) 판 (Silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck KGaA., Germany)에 표준 dioscin과 함께 점적하고, methanol : acetonitrile : 0.02 M phosphate buffer (7:2:1) 용매에서 전개하였으며,<sup>23)</sup> 반점은 iodine 증기로 발색시켜 확인하였다.

**고속 액체 chromatography** - 산약 ethanol 추출물의 dioscin 함량 분석에는 고속 액체 chromatography (HPLC)를 이용하였다. 사용된 HPLC는 Shimadzu Corporation (Japan) 제품 (Model LC-10AT<sub>vp</sub>)이었으며, 용매송출기 (Model SCL-10AD<sub>vp</sub>)와 photodiode array 검출기 (Model SPD-M10A<sub>vp</sub>)로 구성하였다. Dioscin 분리에 이용된 column은 Shimpack VP-ODS column (No. 228-34937-92; I.D., 250×4.6 mm; 5 µm particles)이었으며, 유출 용매는 acetonitril : methanol : 0.01 M phosphate buffer (pH 5.0) (6:3:1, v/v%)로, 검액 20 µl를 주입한 후 유속 1.0 ml/min로 유출하면서 210 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 얻어진 data는 Class-VP5.0 software program으로 분석하였으며, dioscin의 양은 peak 면적을 이용하여 구하였다.

## 결 과

**HPLC를 이용한 dioscin 분석 조건 확립** - 표준 dioscin 용액을 이용하여 HPLC 분석 조건을 조사하였다. 유출 용매로 acetonitril : methanol : 0.01 M phosphate buffer (pH 5.0) (6:3:1, v/v%)를 사용하였을 경우, dioscin의 유지시간은 7.45±0.34분이었으며, dioscin의 peak 면적으로부터 구한 검량선은 0.1~2.0 mg/ml의 범위 내에서 좋은 직선성을 나타내었다 ( $y=1811.2x+121593$ ,  $R^2=0.9967$ ) (Fig. 1).

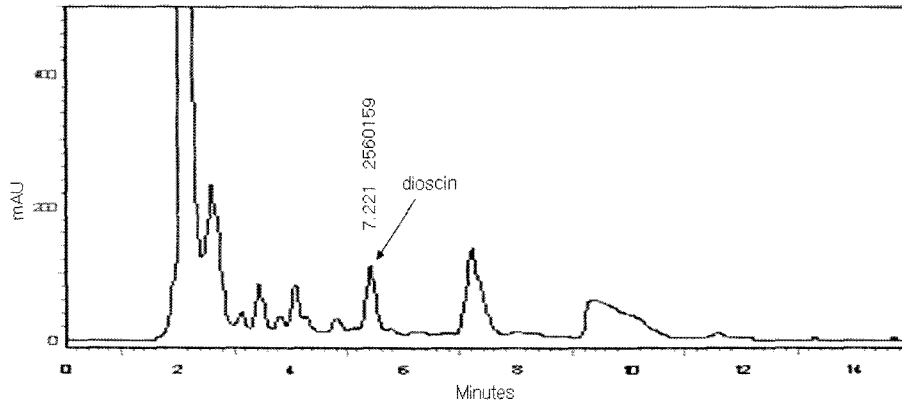


**Fig. 1.** The calibration curve for standard dioscin by HPLC analysis. Column; Shimpack VP-ODS column, sample injection; 20 µl, mobile phase; acetonitril-methanol-0.01 M phosphate buffer (pH 5.0) (6:3:1, v/v%), flow rate; 1.0 ml/min, detector; photodiode array detector (210 nm).

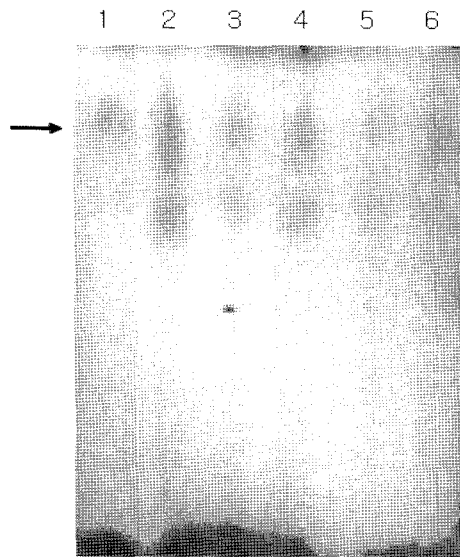
**산약의 dioscin 확인 및 함량 결정** - 시중에서 구입한 산약 시료 (Table I)의 ethanol 추출물을 박층 chromatography로 분석한 결과, Fig. 2와 같이 R<sub>f</sub>치 0.87에서 표준 dioscin과 일치하는 반점을 관찰할 수 있었다. 또한 산약의 ethanol 추출액을 상기에서 확립한 HPLC 분석 조건에 따라 분리한 결과 Fig. 3과 같은 chromatogram을 얻을 수 있었다. HPLC 상에서 분리된 dioscin을 상기에서 작성한 검량선을 이용하여 dioscin 함량을 조사한 결과, Table I에서와 같이 0.076~0.142(w/w)%의 dioscin을 함유하는 것으로 측정되었다.

## 고 찰

이상의 결과로부터 산약(마카루)의 품질평가를 위한 지표 물질로 dioscin을 활용할 수 있다고 판단된다. 비록 황<sup>22)</sup>이



**Fig. 2.** The typical HPLC pattern of ethanol extract from *Dioscorea* rhizoma flour. Column; Shimpack VP-ODS column, sample injection; 20 µl, mobile phase; acetonitril-methanol-0.01 M phosphate buffer (pH 5.0) (6:3:1, v/v%), flow rate; 1.0 ml/min, detector; photodiode array detector (210 nm).



**Fig. 3.** Confirmation of dioscin in the commercial *Dioscorea* rhizoma flour by TLC. TLC plate; Silicagel 60 F<sub>254</sub>, developing solvent; methanol-acetonitril-0.02 M phosphate buffer (7:2:1), visualization; iodine vapor. Lane 1; standard dioscin. lane 2; ethanol extract of sample no. 1, lane 3; ethanol extract of sample no. 2; lane 4; ethanol extract of sample no. 3, lane 5; ethanol extract of sample no. 4, lane 6; ethanol extract of sample no. 5.

이미 산약의 지표물질로 allantoin을 제시하였지만, allantoin은 요산(uric acid)의 산화를 통해 만들어지는 물질로 자연계 동식물에 널리 존재하기 때문에 지표물질로는 적절하지 않다. 그렇지만 dioscin은 *Dioscorea* 근경을 포함한 몇몇 식물 군에서만 발견되며, 특히 산약에서의 함량이 높기 때문에 이를 지표물질로 활용하는 것이 보다 실용적이라고 생각한다. 이 때 산약의 dioscin 함량은 0.05(w/w)% 이상으로 규정하는 것이 타당할 것으로 보인다.

## 사 사

본 연구는 경상북도에서 지원하는 경북바이오산업기술개발사업 (과제번호 A03-11-006)으로부터 얻은 연구 결과 중 일부이므로, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

## 인용문헌

1. Sautour, M., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Wagner, H., and Lacaille-Dubois, M.-A. (2004) A new phenanthrene glycoside and other constituents from *Dioscorea opposita*. *Chem. Pharm. Bull.*, **52**: 1235-1237.
2. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (English Ed.) (1997) Vol. 1, Chemical Industry Press, Beijing, China
3. 대한약전 제8개정판 (2002) 대한약학대학협회의약전분과위원회, 문성사, 서울 (2002)
4. Choi, E. M., Koo, S. J., and Hwang, J.-K. (2004) Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *J. Ethnopharmacol.*, **91**: 1-6.
5. Zhao, G., Kan, J., Li, Z., and Chen, Z. (2005) Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb roots. *Carbohydr. Polymers* **61**: 125-131.
6. Kim, M.-J., Kim, H.-N., Kang, K.-S., Baek, N.-I., Kim, D.-K., Kim, Y.-S., Kim, S.-H., and Jean, B.-H. (2004) Methanol extract of *Dioscorea Rhizoma* inhibits pro-inflammatory cytokines and mediators in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Intern. Immunopharmacol.*, **4**: 1489-1497.
7. Hu, K. and Yao, X. (2003) The cytotoxicity of methyl protodioscin against human cancer cell lines *in vitro*. *Cancer Invest.*, **21**: 389-393.
8. Hu, K. and Yao, X. (2003) The cytotoxicity of methyl protoneograccillin (NSC-698793) and graccillin (NSC-698787), two steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea col-*

- lettii* var. *hypoglauca*, against human cancer cells *in vitro*. *Phytother. Res.*, **17**: 620-626.
9. Yin, J., Tezuka, Y., Kouda, K., Tran, Q. L., Miyahara, T., Chen, Y., and Kadota, S. (2004) Antiosteoporotic activity of the water extract of *Dioscorea spongiosa*. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 583-586.
  10. Hou, W.-C., Chen, H.-J., and Lin, Y.-H. (1999) Dioscorins, the major tuber storage proteins of yam (*Dioscorea batatas* Decne), with dehydroascorbate reductase and monodehydroascorbate reductase activities. *Plant Sci.*, **149**: 151-156.
  11. Hou, W.-C., Lee, M.-H., Chen, H.-J., Liang, W.-L., Han, C.-H., Liu, Y.-W., and Lin, Y.-H. (2001) Antioxidant activities of dioscorins, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne). *J. Agric. Food. Chem.*, **49**: 4956-4960.
  12. McAnuff, M. A., Harding, W. W., Omoruyi, F. O., Jacobs, H., Morrison, E. Y., and Asemota, H. N. (2005) Hypoglycemic effects of steroidal saponin isolated from Jamaican bitter yam, *Disocorea polygonoides*. *Food Chem. Toxicol.*, **43**: 1667-1672.
  13. Kwon, C.-S., Sohn, H.-Y., Kim, S.-H., Kim, J.-H., Son, K.-H., Lee, J.-S., Lim, J.-K., and Kim, J.-S. (2003) Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**: 1451-1456.
  14. Chen, H.-L., Wang, C.-H., Chang, C.-T., and Wang, T.-C. (2003) Effects of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* Thunb var. *pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice. *Nutrition* **19**: 646-651.
  15. Lee, J. M., Lee, J. S., Choi, H. G., Kim, J. Y., Kim, S. D., Lim, S. K., and Nam, D. H. (2005) Effect of ethanol extract from dried chinese yam (*Dioscorea batatas*) flour on gastrointestinal function in rat model. *Arch. Pharm. Res.*, accepted.
  16. Gaidamashvili, M., Ohizumi, Y., Ijima, S., Takayama, T., Ogawa, T., and Muramoto, K. (2004) Characterization of the yam tuber storage proteins from *Dioscorea batatas* exhibiting unique lectin activities. *J. Biol. Chem.* **279**: 26028-26035.
  17. Kawasaki, T. and Yamauchi, T. (1968) Structures of pro-sapogenin-B and -A of dioscin and concurrence of B with dioscin in the rhizoma of *Dioscorea tokoro* Makino. *Chem. Pharm. Bull.*, **16**: 1070-1075.
  18. Sautour, M., Mitaine-Offer, A. C., Miyamoto, T., Dongmo, A., Lacaille-Dubois, M. A. (2004) A new steroidal saponin from *Dioscorea cayenensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **52**: 1353-1355.
  19. Yang, D. J., Lu, T. J., and Hwang, L. S. (2003) Isolation and identification of steroidal saponins in Taiwanese yam cultivar (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 6438-6444.
  20. Dong, M., Feng, X., Wang, B., Wu, L., and Ikejima, T. (2001) Two novel furostanol saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica* Prain et Burkill and their cytotoxic activity. *Tetrahedron*, **57**: 501-506.
  21. Liu, H. W., Wang, S. L., Cai, B., Qu, G. X., Yang, X. J., Kobayashi, H., and Yao, X. S. (2003) New furostanol glycosides from the rhizomes of *Dioscorea futschauensis* R. Kunth. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **5**: 241-247.
  22. Hwang, G. S. (1997) Standardization of *Dioscorea* rhizoma. In *Standardization of natural medicines*, 103-113. Korea Food and Drug Administration. Seoul.
  23. Son, K. S., Seo, J. H., Lee, J. M., Kwon, S. J., Chang, S. Y., and Lee, K. S. (2001) Isolation and quantitative determination of dioscin from *Smilax Chinae* Radix. *Kor. J. Pharmacog.*, **32**: 153-156.

(2006년 1월 13일 접수)